AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL.
VORSTEHER: PROF. DR. R. DOERR.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUSWERTUNG UND DIE WIRKUNGSWEISE DES TETANUSTOXINS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

KARL HALTER

AUS FRAUENFELD

1936

DRUCK DER UNIVERSITÄTSDRUCKEREI H. STÜRTZ A.G., WÜRZBURG

Von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. *R. Doerr*.

Tag der Promotion: 27. April 1936.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck aus „Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten“
Bd. 118, 2. Heft **1936**, Verlag Julius Springer, Berlin.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel.
Vorsteher: Prof. *R. Doerr.*)

Untersuchungen über die Auswertung und die Wirkungsweise des Tetanustoxins *.

Von
Karl Halter.

Die folgenden Untersuchungen sind von Angaben ausgegangen, deren Nachprüfung schon zum Zweck einer einfachen Bestätigung oder Widerlegung erwünscht erschien. Es haben sich dabei aber auch einige neue Tatsachen ergeben, die in verschiedenen Beziehungen Interesse verdienen.

Verwendet wurden zwei Toxine, und zwar:

1. Ein *Trockentoxin*, welches die Behringwerke in Marburg (Prof. *H. Schmidt*) unserem Institut bereitwilligst zur Verfügung gestellt hatten.

2. Eine *Toxinbouillon*, die uns von Prof. *Ramon* (Serumwerke des Institut Pasteur in Paris) auf unsere Bitte hin überlassen wurde. Die Toxinbouillon zeigte trotz Aufbewahrung im Kühlraum eine Abschwächung, indem die Dosis letalis für die weiße Maus** im Laufe von 10 Wochen auf das 3—4fache des ursprünglichen Wertes anstieg; das Trockentoxin hielt sich bei gleicher Temperatur im Exsikkator unverändert.

I. Die Labilität des Tetanustoxins in hoher Verdünnung.

Condréa und *Poenaru* [1] haben mitgeteilt, daß hochwirksame Tetanustoxine einen höheren Titer aufweisen, wenn die zwecks Auswertung notwendige Verdünnung der Stammlösungen mit *Peptonlösung* vorgenommen wird anstatt mit *destilliertem Wasser*.

In unseren eigenen Versuchen wurde nicht destilliertes Wasser mit Peptonlösung, sondern *0,85% NaCl-Lösung* mit einer *Lösung von 1% Pepton Witte in dieser Kochsalzlösung* verglichen. Die Abweichung von der ursprünglichen Versuchsanordnung erwies sich als belanglos, da wir uns ebenfalls von der Überlegenheit der mit Pepton hergestellten Verdünnungen zu überzeugen vermochten; die Differenzen gegenüber den Kochsalzverdünnungen betrugen das 2—5fache, bewegten sich also in ähnlichen Grenzen wie in den Auswertungen von *Condréa* und *Poenaru*, wo sich die durch Pepton erzielte Steigerung der titrierbaren Toxizität auf das $1^1/_2$—7fache belief. Das Phänomen wurde sowohl mit

* Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Basel.

** In sämtlichen Versuchen wurde als „Dosis letalis" für die weiße Maus (abweichend von der üblichen Definition) jene Menge angesehen, welche den Tod infolge von Starrkrampf innerhalb von *10 Tagen* herbeiführte.

Trockentoxin wie mit Toxinbouillon festgestellt, wie aus nachstehender Tabelle hervorgeht:

Tabelle 1.

Toxindosis	Verdünnung mit NaCl	Verdünnung mit Pepton
	A. Toxinbouillon.	
2. 10^{-5} ccm	+ 8. Tag	+ 3. Tag
	starker lokaler Tetanus	+ 4. Tag
1. 10^{-5} ccm	Ø	+ 5. Tag
	Ø	+ 5. Tag
6. 10^{-6} ccm	Ø	+ 5. Tag
	Ø	+ 7. Tag
4. 10^{-6} ccm	Ø	+ 10. Tag
	Ø	schwerer lokaler Tetanus
2. 10^{-6} ccm	Ø	schwerer lokaler Tetanus
	Ø	schwerer lokaler Tetanus
1. 10^{-6} ccm	Ø	leichter lokaler Tetanus
	Ø	deutlicher lokaler Tetanus
6. 10^{-7} ccm	Ø	lokaler Tetanus angedeutet
	Ø	lokaler Tetanus angedeutet
	B. Trockentoxin.	
2. 10^{-7} g	+ 3. Tag	+ 2. Tag
1. 10^{-7} g	+ 4. Tag	+ 3. Tag
6. 10^{-8} g	schwerer lokaler Tetanus	+ 5. Tag
4. 10^{-8} g	lokaler Tetanus	schwerer lokaler Tetanus
2. 10^{-8} g	leichter lokaler Tetanus	lokaler Tetanus
1. 10^{-8} g	Spur	leichter lokaler Tetanus

Stimmen wir somit hinsichtlich der tatsächlichen Beobachtung mit *Condréa* und *Poenaru* überein, so können wir uns der von diesen Autoren angebotenen Erklärung nicht anschließen. Von hypothetischem Beiwerk entkleidet, läuft die Deutung von *Condréa* und *Poenaru* darauf hinaus, *daß das Pepton die Toxizität erhöht*; diese Auffassung wird experimentell durch die Angabe begründet, daß der Zusatz von 1% Pepton eine *sofortige* Steigerung der Giftigkeit zur Folge hat, ja daß die Aktivierung sogar in vivo stattfindet, d. h. daß Grenzdosen stärker wirken, wenn man das Pepton dem Versuchstier *getrennt* injiziert.

In der Versuchsanordnung, deren Ergebnisse in Tabelle 1 zusammengestellt sind, konnte eine sofortige Steigerung der Giftigkeit durch das Pepton nicht zum Ausdruck kommen. Es wurden nämlich zunächst Verdünnungen in Zehnerpotenzen mit Kochsalz- und mit Peptonlösung angelegt und von diesen ausgehend unmittelbar vor der Injektion die feiner abgestuften Verdünnungen. Auf diese Weise blieben beide Verdünnungsflüssigkeiten längere Zeit hindurch mit dem Toxin in Kontakt.

Wir gingen daher in einer zweiten Versuchsserie so vor, daß nur eine einzige Verdünnungsreihe mit Kochsalzlösung angesetzt und jede Verdünnung zu gleichen Teilen einerseits mit Kochsalzlösung und andererseits mit Peptonlösung versetzt wurde; sofort nach der Herstellung der

Gemische injizierten wir gleiche Volumina weißen Mäusen subcutan. Nunmehr war aber die Differenz völlig verschwunden, d. h. die einzelnen Toxindosen wirkten mit und ohne Peptonzusatz ganz gleich, wobei es wieder irrelevant war, ob Trockentoxin oder Toxinbouillon als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Auf die Wiedergabe der Protokolle kann verzichtet werden. Dieses Resultat legte die Vermutung nahe, daß das Toxin nicht durch Pepton aktiviert, *sondern vielmehr durch die Kochsalzlösung abgeschwächt wird.* Unter der a priori wahrscheinlichen Voraussetzung, daß die Toxinzerstörung durch die Kochsalzlösung von der Einwirkungsdauer abhängen müßte, war diese Auffassung ohne weiteres einer experimentellen Verifizierung zugänglich.

Zu diesem Zwecke wurde in gleiche Volumina Kochsalzlösung und Peptonlösung soviel Toxin eingetragen, daß beide Flüssigkeiten in 0,25 ccm rechnungsgemäß die einfach letale Mausdosis enthielten. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden von beiden Verdünnungen je 0,25 ccm entnommen und weißen Mäusen injiziert.

Tabelle 2.

Seit der Herstellung der Verdünnung abgelaufene Zeit	Wirkung von je 0,25 ccm	
	der Kochsalzverdünnung	der Peptonverdünnung
4 Min.	starker lokaler Tetanus	+ 7. Tag
30 Min.	starker lokaler Tetanus	+ 9. Tag
2 Std.	leichter lokaler Tetanus	+ 6. Tag
8 Std.	angedeuteter lokaler Tetanus	+ 6. Tag
14 Std.	angedeuteter lokaler Tetanus	+ 8. Tag
24 Std.	Ø	+ 5. Tag
36 Std.	Ø	+ 9. Tag
12 Tage	--	+ 8. Tag
20 Tage	—	+ 7. Tag

Obzwar nur ein Teil der wirklich ausgeführten Einzelversuche in Tabelle 2 wiedergegeben ist, zeigt sich doch ganz deutlich:

1. Daß die Toxizität der Peptonverdünnung während etwa 3 Wochen auffallend konstant blieb, obwohl sie ohne besondere Sorgfalt aufbewahrt wurde; sie stand in einer mit einem Wattepfropf verschlossenen Eprouvette bei Zimmertemperatur und war dem Tageslichte ausgesetzt.

2. Daß dagegen die Toxizität der Kochsalzverdünnung innerhalb von 24 Stunden so tief absank, daß 0,25 ccm überhaupt keine Reaktion hervorzurufen vermochten. Obschon der Vorgang der Toxinzerstörung als Funktion der Zeit nicht genau analysiert wurde, ist ferner nicht zu verkennen, daß der Prozeß anfangs sehr rasch ablief, und daß die Geschwindigkeit dann immer mehr abnahm. Schon die erste, etwa 4 Min. nach dem Verdünnen mit Kochsalz injizierte Probe wirkte weit schwächer als die gleiche Menge der Peptonverdünnung; auf der anderen Seite dauerte

es mehr als 14 Stunden, bevor die letzten Reste der Giftigkeit schwanden. Exakte quantitative Bestimmungen hätten wohl eine Reaktionskurve von ähnlicher Form ergeben, wie sie *R. Doerr* und *W. Berger* für die Harnstoffzerlegung durch Urease auf interferometrischen Wege ermittelt haben. Wir behalten uns vor, diese Lücke unserer Untersuchungen später auszufüllen.

Rein äußerlich betrachtet, hätte man auf Grund der vorstehenden Versuche zwei Erscheinungen auseinanderzuhalten: 1. Die Stabilität des Toxins in Peptonlösung und 2. seine Labilität in Kochsalzlösung. Es war aber anzunehmen, daß beide Phänomene in der Weise zusammenhängen, daß das Pepton den schädigenden Faktor der Kochsalzlösung unwirksam macht.

Eine bloße Pufferwirkung der Peptonlösung konnte ausgeschlossen werden, wie folgender Versuch lehrte:

Versuch.

Es wurden zwei Toxinverdünnungen hergestellt, die eine mit Phosphatpufferlösung ($p_H = 7{,}2$), die andere mit Kochsalzlösung; beide Verdünnungen enthielten rechnungsgemäß in 0,25 ccm eine letale Mausdosis. Die Verimpfung von je 0,25 ccm auf weiße Mäuse ergab nach verschiedenen Zeitintervallen:

Intervall seit dem Verdünnen	Phosphatpuffer-Verdünnung	Kochsalz-Verdünnung
etwa 2 Min.	+ 6. Tag	+ 7. Tag
4 Stunden	starker lokaler Tetanus	starker lokaler Tetanus
24 Stunden	leichter lokaler Tetanus	∅

Das Toxin büßte somit auch im Phosphatpuffergemisch rasch seine Wirksamkeit ein; zwar verlief die Denaturierung in der NaCl-Lösung etwas schneller, aber die Differenz war jedenfalls unbedeutend und fand in der Folge eine befriedigende Aufklärung, da sich herausstellte, daß auch die Kochsalzlösung das Toxin durchaus nicht unter allen Umständen gleich intensiv beeinflußt.

Von zwei Toxinverdünnungen, welche so eingestellt waren, daß 0,25 ccm unmittelbar nach ihrer Herstellung eine letale Mausdosis enthielt, wurde die eine in einem Erlenmeyerkolben intensiv geschüttelt und erwies sich nach einer Stunde (in der gleichen Menge) als völlig wirkungslos; in der anderen, welche während dieser Zeit bei Zimmertemperatur ruhig gestanden hatte, war die Toxizität zwar ebenfalls abgesunken, aber in weit geringerem Grade, da 0,25 ccm noch einen schweren lokalen Tetanus zu erzeugen vermochten. Da das Tetanustoxin gegen Oxydationsmittel sehr empfindlich ist, konnte der raschere Schwund des Toxins in der geschüttelten Kochsalzverdünnung auf *die Einwirkung der Luft bzw. des Luftsauerstoffes* bezogen werden. Doch schien es notwendig, den mechanischen Faktor des Schüttelns zu eliminieren, was am einfachsten dadurch zu erreichen war, daß die Kochsalzlösung zuerst durch Schütteln mit Luft gesättigt und sodann zum Verdünnen des Toxins benutzt

wurde; zum Vergleich diente eine Probe der gleichen Kochsalzlösung, aus welcher die absorbierte Luft durch Erhitzen im Wasserbade ausgetrieben worden war. Der Erfolg entsprach der Erwartung, indem das Toxin in der geschüttelten Kochsalzlösung ungleich rascher zerstört wurde als in der gekochten, wie der folgende Versuch zeigt:

Versuch.

Aus Toxinbouillon werden einerseits mit geschüttelter, andererseits mit erhitzter Kochsalzlösung zwei Verdünnungen hergestellt, von denen jede rechnungsgemäß in 0,25 ccm eine letale Mausdosis enthält. Beide Verdünnungen bleiben bei Zimmertemperatur stehen; nach verschiedenen Zeitintervallen werden Proben entnommen und 0,25 ccm weißen Mäusen subcutan eingespritzt.

Abgelaufene Zeit	Wirkung der Verdünnungen	
	mit geschüttelter	mit erhitzter NaCl-Lösung
1—2 Min.	leichter lokaler Tetanus	+ 5. Tag
30 Min.	Ø	+ 7. Tag
4 Stunden	Ø	schwerer lokaler Tetanus

Die Stoffgemenge, welche man in der Bakteriologie „Peptone" nennt, sind durch ein hohes Sauerstoffbindungsvermögen ausgezeichnet. Nach *Kovacs* kann man anaerobe Keime in 10%iger Peptonlösung mit Traubenzuckerzusatz ohne Luftabschluß züchten gleich wie in der gebräuchlichen Tarozzibouillon. Die Haltbarkeit des Tetanustoxins in Verdünnungen, welche mit Peptonlösung angefertigt werden (Tabelle 2), läßt sich daher ungezwungen dadurch erklären, daß das Toxin durch das O-bindende Pepton gegen die oxydierende Wirkung des absorbierten Luftsauerstoffes geschützt wird.

Dagegen war es nicht möglich, die schädigende Wirkung der Kochsalzlösung restlos auf ihren akzidentellen Sauerstoffgehalt zurückzuführen. Wir sahen ja in dem obigen Versuch, daß sich das Toxin auch in der durch Erhitzen luftfrei gemachten Kochsalzlösung merklich abschwächt, und zwar schon binnen 4 Stunden. Allerdings könnte in dieser Zeit wieder neuer O aus der Luft aufgenommen werden. Es gelang uns jedoch nicht, höhere Toxinverdünnungen, die unter möglichst geringer Berührung mit Luft und mit ausgekochter Kochsalzlösung angefertigt wurden, dadurch stabil zu erhalten, daß wir sie im Vakuum über Pyrogallol-Kalilauge aufbewahrten, während die Stabilisierung durch 1%iges Pepton leicht und sicher zu erreichen ist. Außer dem zufälligen O-Gehalt scheint die Kochsalzlösung somit noch durch einen anderen Faktor denaturierend auf das Toxin einzuwirken; doch sollte man, um sich von der tatsächlichen Beobachtung nicht zu entfernen, nicht von der schädigenden Wirkung der NaCl-Lösung, sondern von dem Einfluß des Verdünnens mit einer solchen Lösung sprechen. Das kann einen wesentlichen Unterschied bedeuten.

Prüft man nämlich den zeitlichen Ablauf des Toxinschwundes in schwächeren und stärkeren Verdünnungen einer Toxinbouillon, so

konstatiert man, daß die Geschwindigkeit des Prozesses mit steigender Verdünnung zunimmt. Schon Unterschiede von einer Zehnerpotenz geben dabei einen deutlichen Ausschlag.

Versuch.

Mit einer bestimmten Kochsalzlösung wurde eine 1000fache und eine 10 000fache Verdünnung unserer Toxinbouillon angesetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und von der 1000fachen Verdünnung 0,025 ccm, von der 10 000fachen 0,25 ccm auf weiße Mäuse verimpft.

Abgelaufene Zeit	1000fache Verdünnung	10 000fache Verdünnung
1—2 Min.	+ 8. Tag	+ 8. Tag
30 Min.	+ 10. Tag	leichter lokaler Tetanus
4 Stunden	leichter lokaler Tetanus	∅

Ein zweites Experiment dieser Art, in welchem stark lufthaltige (geschüttelte) Kochsalzlösung als Verdünnungsflüssigkeit benutzt wurde, ergab ein analoges Resultat:

1—2 Min.	starker lokaler Tetanus	leichter lokaler Tetanus
30 Min.	leichter lokaler Tetanus	∅
4 Stunden	angedeutet	∅

Da das Ausgangsmaterial — im vorstehenden Versuch die Toxinbouillon — stets Pepton und ähnliche Stoffe enthält, welche durch ihr Sauerstoffbindungsvermögen das Toxin zu schützen vermögen, könnte man den Einfluß des Verdünnungsgrades so auffassen, daß die Konzentration der Schutzstoffe des Ausgangsmateriales mit steigender Verdünnung immer mehr reduziert wird. Damit würde auch die Angabe von *Uschinski* stimmen, daß der Tetanusbacillus in eiweiß- und peptonfreien, sog. synthetischen Nährböden zwar stark wirksame, aber wenig haltbare Toxine erzeugt. Indes bestehen doch einige Bedenken gegen diese Deutung. Vorerst fällt es auf, daß in einer 1000fach verdünnten Toxinbouillon noch immer eine genügende Konzentration des Peptons und analoger Substanzen vorhanden sein soll, um einen merklichen Unterschied gegenüber einer 10 000fachen Verdünnung zu bedingen. Sodann wird ja nicht bloß das „Pepton", sondern auch das Toxin verdünnt und es müßte somit zunächst bewiesen werden, daß nur der erste Faktor maßgebend, der zweite bedeutungslos ist. Um Klarheit zu schaffen, müßten analoge Versuche wie die hier mitgeteilten mit Toxinen von verschiedener Wirkungsstärke sowie mit weitgehend gereinigten Toxinpräparaten ausgeführt werden; ferner wäre der Schutzwert des Peptons quantitativ zu bestimmen, indem man feststellt, welche Konzentrationen desselben notwendig sind, um hohe Kochsalzverdünnungen zu stabilisieren. Wir wollen auf diese Punkte in späteren Mitteilungen zurückkommen. Vorläufig sei betont, daß das hier geschilderte Verhalten des Tetanustoxins beim Verdünnen mit Kochsalzlösung und ganz besonders der Einfluß des Verdünnungsgrades auf die Toxinzerstörung die weitgehendste Ähnlichkeit mit den Beobachtungen aufweisen, die man bei

der Auswertung von Virusarten mit Hilfe der Verdünnungsmethode gemacht hat (*Doerr* und *Seidenberg* [2], *Ruppin* [3], *G. Pyl* [4]).

Mit der Abhängigkeit der Toxinzerstörung vom Grade der Verdünnung steht noch eine andere Erscheinung in Konnex, die bei der Titrierung eines Toxins auftreten kann und die ebenfalls eine bisher nicht beachtete Fehlerquelle repräsentiert. Wirft man einen Blick auf die Tabelle 1, so fällt es in der ersten Vertikalreihe auf, daß die Dosis von $2 \cdot 10^{-5}$ ccm noch stark toxisch war, während die nächst niedrigere Dosis von $1 \cdot 10^{-5}$ ccm überhaupt nicht mehr wirkte. Sonst erhält man bei hinreichend feiner Abstufung der fallenden Giftmengen auch eine korrespondierende Abstufung der Giftwirkungen, wie das in der zweiten Vertikalrubrik der gleichen Tabelle de facto der Fall war. Das *unvermittelte „Abreißen der Auswertungsreihen"* wurde nur bei den Verdünnungen mit Kochsalzlösung beobachtet und gab den ersten Hinweis auf die rasche Abschwächung, denen das Toxin in höheren Kochsalzdilutionen unterliegt. Es stellte sich in der Folge heraus, daß das „Abreißen" immer dann erfolgte, wenn zunächst in Zehnerpotenzen verdünnt und diese Verdünnungen benützt wurden, um aus denselben unmittelbar vor der Injektion die feiner abgestuften Verdünnungen herzustellen. Wurde nun von zwei aufeinanderfolgenden Dosen die größere aus einer schwächeren, die kleinere aus einer stärkeren Zehnerverdünnung genommen, so trat das „Abreißen" in Erscheinung. Da für das Anlegen einer Titrierungsreihe stets eine gewisse Zeit erforderlich ist, konnten sich eben in zwei benachbarten Zehnerverdünnungen infolge ihrer differenten Labilität große Unterschiede im Gehalt an noch unzerstörtem Gift herausbilden, die nicht mehr dem rechnungsmäßigen Verdünnungsgrad entsprachen.

In versuchstechnischer Hinsicht folgt aus diesen Untersuchungen, daß man bei der Auswertung des Tetanustoxins richtigere Resultate erhält, wenn man als Lösungsmittel bzw. als Verdünnungsflüssigkeit Peptonwasser oder sterile Nährbouillon verwendet. Benützt man dagegen Kochsalzlösung, so resultieren für die minimal-tödlichen Dosen zu hohe Werte und die Abweichungen vom wahren Titer werden besonders groß, 1. wenn man die Titrierungen an kleinen und sehr empfindlichen Versuchstieren (Mäusen oder Meerschweinchen) vornimmt, weil dann sehr hohe Verdünnungen notwendig werden, um die Grenze zu erreichen; 2. wenn die Kochsalzlösung nicht frisch sterilisiert oder erhitzt ist, sondern durch längere Aufbewahrung lufthaltig wurde; 3. wenn man die angesetzten Verdünnungen vor dem Injizieren längere Zeit stehen läßt; 4. wenn man, wie dies fast immer geschieht, bei der Herstellung der Verdünnungen die Flüssigkeiten (Toxinverdünnungen) wiederholt mit der Pipette aufzieht und unter Schaumbildung wieder in die Eprouvetten zurückbläst; 5. wenn man Toxinpräparate von starker Giftigkeit auswertet, weil dann ebenfalls hohe Verdünnungen erforderlich sind. Selbstverständlich können sich auch alle oder mehrere der genannten Faktoren

miteinander kombinieren. Experimente, in welchen die Beweisführung ganz oder zum großen Teile auf die Zuverlässigkeit der quantitativen Angaben aufgebaut ist, könnten sich unter solchen Umständen als nicht-reproduzierbar erweisen; das braucht wohl nicht weiter ausgeführt zu werden. Bei Versuchen an Kaninchen, Hunden, Katzen usw. kommen die hier aufgezeigten Fehlerquellen infolge der größeren Toxin-Dosen bzw. der schwächeren Verdünnung der Ausgangspräparate nicht in gleichem Ausmaße in Betracht; käme es jedoch auf feine quantitative Differenzen an, so wäre der „Kochsalzfehler" auch in Experimenten an größeren Tieren nicht als bedeutungslos anzusehen.

Schließlich sei darauf aufmerksam gemacht, daß die Dosis minima letalis für die weiße Maus oder für das Gramm Mausgewicht als Einheit gilt, in welcher die Toxinmenge ausgedrückt wird. Ist diese Einheit falsch bestimmt worden, so muß sich die Differenz bei der Umrechnung höherer Dosen in Einheiten multiplizieren, und die zahlenmäßigen Angaben verlieren, besonders wenn sie sich auf große Toxinquanten (z. B. auf die Dosis minima letalis für ein Kaninchen von 2000 g) beziehen, unter solchen Umständen jeden Vergleichswert.

II.

Möglicherweise haben die im vorausgehenden Abschnitt dargelegten Verhältnisse bei den Beobachtungen von *Perrin* und *Cuénot* [5] eine Rolle gespielt, wonach *albinotische Meerschweinchen* eine erheblich geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Tetanustoxin zeigen sollen als farbige. In genauen und mit allen Kautelen ausgeführten Parallelauswertungen des Trockentoxins an albinotischen und farbigen Meerschweinchen von gleichem Körpergewicht konnten wir jedoch diese Angabe *nicht* bestätigen. Als Beispiel mag ein solcher Versuch an Meerschweinchen von 300 g (Injektionsvolum = 0,5 ccm, intramuskuläre Injektion am Oberschenkel) hier angeführt werden.

Versuch.

Toxindosis	Albinos	Farbige
$2{,}10^{-6}$ g	+ 2. Tag	+ $1^1/^2$ Tag
$1{,}10^{-6}$ g	+ 2. Tag	+ $2^1/^2$ Tag
$5{,}10^{-7}$ g	+ 4. Tag	+ 5. Tag
$2{,}10^{-7}$ g	lokaler Tetanus	lokaler Tetanus
$1{,}10^{-7}$ g	„ „	„ „

III. Der Einfluß der Entzündung auf den Verlauf der Tetanusvergiftung.

Ramon und *Lemétayer* [6] haben kürzlich über folgende interessante Versuche berichtet: Sie injizierten 2 Serien von Kaninchen subcutan mit zahlreichen, weit unter der Letalitätsgrenze liegenden Einzeldosen von Tetanustoxin. Bei einer Serie wurden die Injektionsstellen diffus über die Körperoberfläche verteilt; in diesem Falle war die Wirkung

ungefähr die gleiche als wenn die ganze Toxinmenge auf einmal injiziert worden wäre und die Kaninchen verendeten im Starrkrampf. Bei den anderen Serien wurden die Einzeldosen immer an derselben Stelle appliziert, welche sich infolgedessen stark entzündete; hier blieben die tetanischen Symptome aus und das Serum der Tiere zeigte schon nach kurzer Frist einen bemerkenswert hohen Antitoxingehalt.

Die Fraktionierung der Dosis vermochte den Eintritt eines letal ablaufenden Tetanus nicht zu verhindern, wie das Verhalten der ersten Serie bewies; wenn somit die Kaninchen der zweiten Serie symptomlos überlebten, so konnte dies nur durch die Injektion in dieselbe Gewebspartie bzw. durch die auf diese Weise erzeugte Entzündung erklärt werden. *Ramon* und *Lemétayer* nehmen demgemäß an, daß das Toxin im Entzündungsherd seine Giftigkeit einbüßt, seine Antigenfunktion aber bewahrt; so wäre die Unschädlichkeit der wiederholten Einspritzung minimaler Toxindosen in die gleiche Stelle der Subkutis ebenso zu verstehen wie die beschleunigte und gesteigerte Antitoxinproduktion.

Wir wollten zuerst von der Versuchsanordnung der französischen Autoren ausgehen, gaben aber diese Absicht wieder auf, weil das Endresultat offenbar von mehreren Faktoren bestimmt wird. So haben wir uns selbst überzeugt, daß die „entgiftende Entzündung" nicht so früh einsetzen und — namentlich im Beginne — nicht so intensiv sein muß, wie in den Experimenten der französischen Autoren; auch kann der zeitliche Ablauf der Antitoxinbildung variieren und auf das Eintreten oder Ausbleiben von lokalen oder allgemeinen Tetanussymptomen entscheidenden Einfluß nehmen. Es schien daher zweckmäßig, die Wirkung der Entzündung auf das Toxin möglichst isoliert zur Geltung zu bringen und die Entwicklung der Entzündung nicht gewissermaßen dem Zufall zu überlassen, sondern durch ein bekanntes, dosierbares und sicher wirksames Agens auszulösen.

Als entzündungserregende Mittel wurden verwendet: 1. ein Gift, das *Abrin* in der Form des *Merk*schen Jequiritols und 2. *Vaccinevirus*, ein Infektionsstoff.

Als Injektionsstelle wurde nicht die Subcutis gewählt, sondern die Muskulatur, und zwar jene Muskelgruppe, welche der Schienbeinkante lateral angelagert ist und die Beugung des Fußes gegen den Unterschenkel bewirkt. Diese Muskelgruppe ist beim Kaninchen genügend groß, um ein Injektionsvolum von 0,5—1,0 ccm aufzunehmen, ist gut abgrenzbar und infolge ihrer topographischen Beziehungen zur Tibiakante bereitet es auch bei wiederholten Injektionen keine Schwierigkeiten, das Injektionsgut an der annähernd gleichen Stelle zu deponieren. Die Injektionen des Toxins in das bereits entzündete Muskelgewebe müssen in kleinem Volum (0,25—0,5 ccm) und äußerst langsam ausgeführt werden, da sonst das Gift nach dem Herausziehen der Kanüle wieder aus dem Stichkanal heraussickert; große Injektionsvolumina und hoher Injektionsdruck schließen auch die Gefahr in sich, daß das Toxin bis in nicht-entzündete Gewebspartien vorgetrieben werden kann.

Die Entzündung nach Jequiritol-Injektion trat äußerlich erst nach Ablauf einiger Stunden in Erscheinung und erreichte ihr Maximum nach 2 Tagen. Die Hyperämie war (bei intramuskulärer Injektion) sehr intensiv, das Ödem hielt sich in mäßigen

Grenzen, die Beteiligung des subcutanen Gewebes war gering. Unter „Dosis 1" ist eine willkürlich gewählte, jedoch in allen Versuchen konstante Jequiritolmenge zu verstehen, welche das Volum der oben bezeichneten Muskelgruppe binnen 48 Stunden auf das Doppelte anschwellen ließ.

Die Vaccinelymphe wurde in der Menge von 0,02 ccm injiziert und erzeugte in 4 Tagen eine ungefähr ebenso starke Schwellung der injizierten Muskelgruppe wie das Jequiritol in der Einheitsdosis binnen 2 Tagen; in der Regel machte aber der Prozeß nach dem 4. Tage noch weitere Fortschritte und führte durch ausgedehntes Übergreifen auf das Unterhautzellgewebe oft zu einer mächtigen Anschwellung der ganzen Extremität. Die Hyperämie war weniger ausgesprochen, das Ödem stark ausgeprägt, so daß die Gewebe blaß erschienen.

Zahlreiche Tiere gingen interkurrent, d. h. nicht an der Vergiftung mit Tetanustoxin, sondern an der Abrinvergiftung oder den Folgen der Vaccineinfektion ein. Von den größeren Versuchsserien waren daher nur immer wenige Teilresultate verwendbar; die restlichen Kombinationen mußten wiederholt werden. Die Zusammenstellung der brauchbaren Ergebnisse lieferte aber schließlich doch ein recht anschauliches Bild, wie aus Tabelle 3 hervorgeht, in welcher die Einzelexperimente samt den zugehörigen Kontrollen nach steigenden Toxindosen (Milligramm Trockentoxin) geordnet erscheinen.

Tabelle 3. Wirksamkeit des Tetanustoxins bei der Injektion in entzündete und in nicht entzündete Muskulatur.

Bezeichnung des Kaninchens	Art der Vorbehandlung	Intervall in Tagen	Toxindosis mg	Resultat
58	Jequiritol Dosis 2	4 Tage	0,05	Ø
59 (Kontrolle)	—	—	0,05	mäßiger lokaler Tetanus
35	Jequiritol Dosis 10	2 Tage	0,15	angedeuteter lokaler Tetanus
36 (Kontrolle)	—	—	0,15	starker lokaler Tetanus, der sich nicht ausbreitet, überlebt
93	Jequiritol Dosis 1	3 Tage	0,5	leichter lokaler Tetanus
94	Vaccine	3 Tage	0,5	leichter lokaler Tetanus
49	Vaccine	4 Tage	1,0	leichter lokaler Tetanus, am 7. Tag descendierender (generalisierter) Tetanus, + 14. Tag
65	Jequiritol Dosis 2	4 Tage	1,0	leichter lokaler Tetanus, überlebt
67 (Kontrolle)	—	—	1,0	lokaler und ascendierender Tetanus, + 5. Tag
91	Jequiritol Dosis 1	5 Tage	1,0	sehr leichter, lokaler Tetanus, überlebt
86	Jequiritol Dosis 1	2 Tage	1,0	ascendierender Tetanus, + 8. Tag
89 (Kontrolle)	—	—	1,0	wie Kontrolle 67
71	Vaccine	3 Tage	2,5	leichter lokaler Tetanus, am 4. Tag descendierend, + 15. Tag
69 (Kontrolle)	—	—	2,5	ascendierender Tetanus, + 4. Tag
72	Jequiritol Dosis 1	3 Tage	2,5	Wie Nr. 71, + 9. Tag

Die Resultate lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Kleine Toxindosen, welche bei den Kontrollen noch eine Starre der hinteren Extremität zu erzeugen vermochten (0.05 mg), erwiesen sich als völlig unwirksam, wenn sie in die entzündete Muskulatur injiziert wurden.

2. Dosen von 0,15 mg (= $^3/_5$ der Dosis minima letalis für intramuskulär injizierte Kaninchen von gleichem Körpergewicht) erzeugten bei der Kontrolle einen starken, in den Entzündungsherd eingeführt nur einen angedeuteten lokalen Tetanus. Die abschwächende Wirkung der Entzündung auf die Entstehung bzw. auf den Verlauf der lokalen Muskelstarre war somit gut ausgeprägt.

3. Die doppelte letale Dosis (0,5 mg) rief einen leichten, jedoch deutlichen lokalen Tetanus hervor, der sich aber weder auf die kontralaterale Hinterextremität noch auch kranialwärts ausbreitete; die Tiere blieben am Leben. Bei nichtvorbehandelten Kontrollen führte schon die Hälfte (0,25 mg), an der gleichen Stelle intramuskulär injiziert, binnen 8 Tagen zum Exitus.

4. 1 mg Trockentoxin tötete die Kontrollen in 5—7 Tagen. Die prophylaktisch angeregte Entzündung wirkte sich nicht bei allen vorbehandelten Tieren ganz gleichmäßig aus. Zwei Kaninchen (65 und 91) bekamen nur einen leichten, lokalen Tetanus und überlebten. 49 zeigte bis zum 7. Tage ebenfalls nur einen leichten lokalen Tetanus; dann aber, *also nach einer für diesen dosologischen Bereich ganz ungewöhnlich langen Inkubation*, setzte ein descendierender und schließlich generalisierter Starrkrampf ein, dem das Tier erst nach Ablauf einer weiteren Woche erlag. Kaninchen 61 tritt so sehr aus der Reihe heraus, daß wir in diesem Falle einen Versuchsfehler (Injektion in nicht-entzündete Muskelpartien) anzunehmen geneigt sind.

5. Bei 2,5 mg (= 10 letalen Dosen) wurde das gleiche Verhalten wie bei Kaninchen 49 (siehe sub. 4) regelmäßig beobachtet: zunächst eine leichte lokale Muskelstarre, dann nach langer Inkubation (4—6 Tage) generalisierte Symptome, Exitus am 9. bzw. 15. Tag.

Um zu einem Verständnis dieser Tatsachen zu gelangen, wurde nun zunächst versucht, die *Schicksale des in die entzündete Muskulatur injizierten Toxins* zu verfolgen und als Vergleichsobjekt die homologe, nicht in Entzündung versetzte Muskelgruppe der anderen Körperseite desselben Kaninchens zu benützen. Auf beiden Seiten wurde natürlich dieselbe Toxindosis zur selben Zeit und in gleichem Flüssigkeitsvolumen eingespritzt (0,5 mg Trockentoxin = 2 letale Kaninchendosen in 0,25ccm); die einseitige entzündungserregende Injektion (Jequiritol) fand 2 Tage vor der bilateralen Toxininjektion statt. Nach abgestuften Zeitintervallen (1, 12, 24 und 48 Stunden) wurden die Kaninchen getötet und folgende Gewebspartien auf ihren Gehalt an aktivem Toxin untersucht:

1. Die entzündete und die kontralaterale nichtentzündete *Muskelgruppe:* Zerkleinerung mit der Schere, Abwägen von 4 g, Verrühren unter

Zusatz von 10 ccm Kochsalzlösung, Injektion von weißen Mäusen mit dem flüssigen Muskelextrakt in Dosen von 0,5 und von 0,012 ccm.

2. Die *poplitealen Lymphdrüsen* der entzündeten und der nichtentzündeten Körperseite. Diese Drüsen sind auch im Normalzustand leicht aufzufinden und herauszupräparieren; sie und nicht die Leistendrüsen sind in unserer Versuchsanordnung als die hauptsächlichen regionären Lymphknoten des vergifteten Gewebsbezirkes zu betrachten, was unter anderem auch daraus hervorgeht, daß die Poplitealdrüse am 2. Tage nach einer Jequiritolinjektion in die Unterschenkelmuskulatur stets stark geschwollen, gerötet und oft auch von Blutungen durchsetzt ist. Die Poplitealdrüsen wurden als Ganzes verrieben, da es sich um den Gesamtgehalt an Toxin handelte; pro Drüse wurde nur wenig Kochsalzlösung (0,75 ccm) beim Verreiben zugesetzt und der ganze auf diese Weise erhaltene Extrakt weißen Mäusen eingeimpft.

Tabelle 4. Nachweis von Tetanustoxin in den regionären Lymphdrüsen und der vergifteten Muskulatur nach der Injektion in normale und in entzündete Muskelgruppen.

Bezeichnung des Kaninchens	Intervall zwischen Toxininjektion und Tötung des Tieres in Std.	Wirkung der Lymphdrüsenextrakte auf der		Muskelextrakte			
				0,5 ccm		0,012 ccm	
		entzünd. S.	Kontrolls.	entzünd. S.	Kontrolle	entzünd. S.	Kontrolle
L. 81	1 Std.	leichter lokaler Tetanus	+ 3. Tag	—	—	—	—
L. 90	12 Std.	leichter lokaler Tetanus	+ 3. Tag	+ 2. Tag	+ 2. Tag	+ 3. Tag	+ 4. Tag
F. 105	24 Std.	+ 3. Tag	+ 2. Tag	+ 2. Tag	+ 2. Tag	starker lokaler Tetanus	starker lokaler Tetanus
F. 106	48 Std.	An-	+ 6. Tag	+ 5. Tag	+ 5. Tag	lokaler Tetanus	An-
R. 3	48 Std.	deutung Ø	An- deutung	leichter lokaler Tetanus	leichter lokaler Tetanus	Ø	deutung Ø

Bei der Interpretation dieser Befunde hat man sich vor Augen zu halten, daß die beidseits in die Muskeln injizierte Toxindosis etwa 10 000 letalen Mausdosen entsprach; findet man somit in einer Poplitealdrüse eine letale Mausdosis oder weniger, so ist dies ein verschwindender Bruchteil des einverleibten Toxinquantums. Ferner hat man sich zu erinnern, daß peripher injiziertes Tetanustoxin nach den Untersuchungen von *Teale* und *Embleton*[7] rasch resorbiert wird und schon nach 45 Min. im Chylus des Ductus thoracicus erscheint. Was man somit durch die Untersuchung der Poplitealdrüse nach einem bestimmten Intervall erfaßt, ist gewissermaßen eine Momentaufnahme eines länger dauernden Vorganges und bezieht sich nur auf einen Teil dieses Vorganges, da ja

nicht alles Toxin, das man intramuskulär einspritzt, den Weg über die Poplitealdrüse nehmen muß.

Nun ergab die Untersuchung der Lymphdrüsen auf ihren Toxingehalt zu allen Zeiten eine stark ausgeprägte Differenz zugunsten der normalen Seite; auch bei Kaninchen F 105 wäre der Unterschied größer gewesen, wenn nicht der ganze Extrakt der Poplitealdrüse auf die Mäuse verimpft worden wäre, sondern nur eine Quote desselben. Daß die Drüsen nach 48 Stunden überhaupt noch Gift enthielten, konnte nicht überraschen, da sich zu dieser Zeit das Toxin auch noch in den injizierten Muskeln, also im tributären Resorptionsbezirk dieser Lymphdrüsen vorfand. Die festgestellte Differenz zwischen der entzündeten und der normalen Seite ist dagegen a priori vieldeutig und es lassen sich, wie wir sehen werden, nicht alle denkbaren Kombinationen sicher beurteilen:

a) Zunächst könnte man im Hinblick auf die bekannten Experimente von *V. Menkin*[8] annehmen, daß das Toxin im entzündeten Muskel zurückgehalten wird, und daß dieser Umstand dafür verantwortlich zu machen sei, daß das Gift nur in geringen Mengen die regionären Drüsen erreicht. Daß intramuskulär injiziertes Trypanblau unter normalen Verhältnissen in der zugehörigen Lymphdrüse erscheint und daß es daselbst nur in Spuren auftritt, wenn das Trypanblau in einen entzündeten Muskel eingespritzt wird, können wir auf Grund eigener Versuche bestätigen. Es ist aber fraglich, ob man das Tetanustoxin mit dem Trypanblau oder den anderen Stoffen, mit welchen *Menkin* arbeitete, auf eine Stufe stellen darf. Aus den in Tabelle 4 dargestellten Experimenten ergibt sich jedenfalls kein Anhaltspunkt für eine speichernde Wirkung entzündeter Gewebe; die Extrakte aus den entzündeten Muskeln zeigten während der 48stündigen Beobachtungsdauer dieselbe Giftigkeit wie die homologen, nicht entzündeten Muskeln, d. h. der *Toxingehalt nahm auf beiden Seiten in gleichem Tempo ab.*

Wir versuchten überdies, die Entzündung und den lymphogenen Abtransport räumlich zu dissoziieren, indem wir die Einheitsdosis Jequiritol möglichst *peripher* und *subcutan* in der Höhe der Tarsometatarsalgelenke einer Körperseite injizierten. Binnen 2 Tagen entstand eine heftige nässende Entzündung der betroffenen Hautstelle, in deren Gefolge die gleichseitige Poplitealdrüse hyperämisch wurde und stark anschwoll. Nun wurde genau wie in den Versuchen der Tabelle 4 0,5 mg Toxin *beiderseits* in die — in diesem Falle nicht entzündete — Unterschenkelmuskulatur eingespritzt, die Kaninchen nach einiger Zeit getötet und die Poplitealdrüsen beider Seiten auf weiße Mäuse in der bereits beschriebenen Weise übertragen.

Bezeichnung des Kaninchens	Intervall	Wirkung des Lymphdrüsenextraktes der entzündeten S.	der normalen S.
L 92	1 Stunde	+ 4. Tag	+ 2. Tag
R 1	10 Stunden	+ 7. Tag	+ 3. Tag
S 45	10 Stunden	mäßiger lokaler Tet.	+ 3. Tag

Auch bei dieser Versuchsanordnung wurde somit die gleiche Differenz beobachtet wir in Tabelle 4, obgleich die vergifteten Muskeln weder rechts noch links mit dem Jequiritol in unmittelbare Berührung gekommen waren. Es schien zu genügen, wenn in einer Lymphdrüse von einer beliebigen Stelle aus ein entzündlicher Zustand induziert wurde, in der kontralateralen nicht.

b) Die sub. a) angeführten Argumente sprechen gleichzeitig dagegen, daß im *entzündeten Muskel* eine gesteigerte Toxinzerstörung oder Umsetzung in antigenes Toxoid (*Ramon* und *Lemétayer*) stattfindet. Wohl aber wäre es möglich, daß sich solche Vorgänge in entzündeten Lymphdrüsen abspielen bzw. daß diese entgiftende Funktion des lymphatischen Gewebes im Entzündungszustand gegenüber der Norm erheblich verstärkt ist *. Versuche, stark verdünnte Toxinlösungen durch Verreiben mit entzündeten Lymphdrüsengewebe in vitro zu entgiften, lieferten allerdings negative Resultate; doch wäre dies kein Beweis, daß das lebende Gewebe zu solcher Leistung nicht befähigt ist.

Greifen wir nun nochmals auf die Grundversuche in Tabelle 3 zurück, so sind hier vom pathologisch-physiologischen Standpunkte zwei Erscheinungen auseinanderzuhalten:

1. Die Tatsache, daß die Injektion von Tetanustoxin in entzündete Muskeln (innerhalb eines bestimmten dosologischen Bereiches) das Auftreten *des generalisierten Tetanus (bzw. des descendierdenen Tetanus) verhindert oder ganz erheblich verzögert.* Es wird von keiner Seite bestritten, daß diese Vergiftungsform nur dadurch entsteht, daß das Toxin in das Blut aufgenommen wird; diskutiert wird nur über den Weg, den das kreisende Toxin einschlagen muß, um zu seinen Angriffspunkten zu gelangen. Wenn somit die Injektion des Toxins in entzündete Muskulatur das Zustandekommen dieser Vergiftungsform antagonistisch beeinflußt,

* Dem Entzündungsprozeß *als solchem* kann auch aus dem Grunde keine toxinzerstörende Wirkung zugeschrieben werden, weil festgestellt wurde, daß sich keine wesentlichen Unterschiede ergeben, wenn man Tetanustoxin (in Dosen von 0,5, 1,0 und 2,5 mg) in den durch Jequiritol entzündeten oder in den normalen Hoden gleich schwerer Kaninchen injiziert. Sollte also in den entzündeten Lymphknoten de facto ein Abbau oder eine Inaktivierung von Tetanustoxin stattfinden, wie das aus unseren Versuchen gefolgert werden könnte, so wäre dies nicht auf die Entzündung, sondern auf die durch die Entzündung gesteigerte Funktion des lymphatischen Gewebes zurückzuführen. Wahrscheinlich erfolgt die Aufnahme des Tetanustoxins aus dem Hodenparenchym in das Blut direkt und der Weg über die Lymphgefäße und Lymphdrüsen spielt keine oder nur eine untergeordnete Rolle. In quantitativer Hinsicht wirken jedenfalls intratestikuläre Injektionen wie intravenöse, d. h. man kann nach unseren Erfahrungen den *descendierenden Tetanus* durch annähernd gleich niedrige Dosen hervorrufen. Will man dagegen diese (auf hämatogener Generalisation beruhende) Vergiftungsform nach dem Vorgange von *Zupnik* [10], *Sawamura* [17], *Descombey* und *Robin* [18] durch *subcutane* Injektionen in muskelfreien Körperstellen erzeugen, so braucht man, wie wir uns überzeugen konnten erheblich höhere Giftmengen als für intratestikuläre Impfungen, woraus sich gleichfalls der Schluß auf die Besonderheit der Resorptionsverhältnisse im Hoden ableiten läßt.

kann dies nur darauf beruhen, daß das auf solche Weise einverleibte Toxin in geringerer Menge und in verzögertem Tempo in die Zirkulation übertritt. Worauf dies zurückzuführen ist, konnte nicht sicher entschieden werden, da weder die Speicherung im Sinne von *V. Menkin* noch die Entgiftungshypothese (*Ramon* und *Lémetayer*) alle experimentellen Ergebnisse zu befriedigen vermochte.

2. Wirkt die Toxininjektion in entzündete Muskulatur auch der Entstehung des lokalen Tetanus und des anschließenden Tetanus ascendens entgegen. Über den Mechanismus des lokalen Tetanus gehen die Ansichten auch heute wieder (*J. Abel* und seine Mitarbeiter [9]) auseinander, indem von einer Seite eine direkte Wirkung des Giftes auf die Muskelfasern oder die terminalen Nervenendigungen (*L. Župnik* [10], *J. Abel*), auf der anderen eine nervöse Zuleitung des Toxins zu den motorischen Zentren in den Vorderhörnern des Rückenmarkes (*Meyer* und *Ransom* [11]) angenommen wird. Beide Theorien werden sich nun mit dem Einfluß der Entzündung auf den lokalen Tetanus abfinden müssen, wobei die Feststellung in den Vordergrund zu treten hat, daß sich das Toxin im entzündeten Muskel ebenso lange und nach unseren Versuchen auch in derselben Kozentration hält wie im homologen normalen Muskel.

Im teleologischen Ideenkreis über das Entzündungsproblem hat sich unter anderem auch die Vorstellung einer „*Ausschwemmung*" der im Entzündungsgebiete vorhandenen schädlichen Substanzen entwickelt. So schreibt *Askanazy* [12] (1929): „Die seröse Überflutung wäscht den mit differenten Stoffen des Entzündungsreizes und des gestörten Stoffwechsels beladenen Boden aus und wird Gifte verdünnen." In dem hier diskutierten Falle kann aber, wie wir sahen, von einer Ableitung des Giftes durch „Ausschwemmung" keine Rede sein; das Gift ist im gleichen quantitativen Ausmaße da wie im nichtentzündeten Gewebe und hat auch gleichviel Zeit sich auszuwirken. Eine Verminderung der Toxinkonzentration durch die in das entzündete Muskelgewebe austretende Ödemflüssigkeit wäre allerdings möglich; wenn aber die Muskelfasern oder die terminalen Nervenendigungen von dem Gifte direkt angegriffen würden, müßten sie eine Affinität zu demselben besitzen und es wäre schwer vorstellbar, daß die durch das Ödem bedingten Konzentrationsunterschiede die zur Giftwirkung führende Bindung vereiteln oder erheblich erschweren.

Doerr und *Seidenberg*, injizierten Kaninchen ein und dieselbe Toxindosis in sehr verschiedenem Flüssigkeitsvolumen (0,05—10,0 ccm) intramuskulär, konnten aber keinen Unterschied der Giftwirkung beobachten. Das ist indes kaum beweisend, da das Lösungsmittel im normalen Muskel ziemlich rasch resorbiert und das weniger diffusible Toxin somit wieder „eingedickt" wird; im entzündeten Muskel wird dagegen der durch das Ödem bedingte Verdünnungszustand lange Zeit hindurch aufrechterhalten. Eher könnte man eine andere Beobachtung von *Doerr*, *Seidenberg* und *Magrassi* [13] gelten lassen, derzufolge ein und dieselbe Toxindosis bei

Kaninchen von geringerem Körpergewicht bzw. geringerer Größe lokalen Tetanus zu erzeugen vermag, während sie bei größeren Kaninchen wirkungslos bleibt. Es wäre nicht zu verstehen, daß — bei gleichem Injektionsvolum — durch die Größe der Versuchstiere Konzentrationsunterschiede an der Injektionsstelle entstehen könnten, die man für die differente Wirkung verantwortlich machen könnte.

Daß der verschiedene Toxingehalt der regionären Lymphdrüsen entzündeter und nichtentzündeter Muskeln (s. oben) für die Entwicklung des lokalen Tetanus nicht in Betracht kommt, ist klar. Was über die Lymphdrüsen geht, gelangt in das Blut und wird somit vom vergifteten Muskel *abgeleitet*; wie immer man aber den *lokalen* Tetanus bisher zu begreifen suchte, galt doch immer die Voraussetzung als selbstverständlich, daß die *Aufnahme des Giftes* im Muskel selbst erfolgen müsse und die Divergenz der Hypothesenbildung beschränkte sich nur auf den Ort der Auswirkung (an der Kontaktstelle oder am Ziel einer in den Muskeln beginnenden und im Rückenmark endenden Bahn).

Die Theorie der Nervenleitung *(H. Meyer* und *Ransom)* wäre mit dem antagonistischen Einfluß der Muskelentzündung auf die Entstehung des lokalen Tetanus vereinbar, ohne daß man — im Widerspruch zu unseren Befunden — eine Toxinzerstörung im Entzündungsgebiete annehmen müßte. *J. M. Lasowsky* und *M. M. Kogan* [14] haben gezeigt, daß Nerven, welche in einem entzündeten Muskel liegen, am Entzündungsprozesse teilnehmen und daß sich sowohl die interstitiellen wie die degenerativen Veränderungen im Nerven wie in einer präformierten Bahn weit hinaus über das eigentliche Entzündungsgebiet in zentripetaler Richtung fortpflanzen. In gleichem Sinne sind wahrscheinlich auch die Experimente von *R. Spitzer* [15] zu deuten, welcher durch Injektion eines Jequirity-Macerates in die freigelegte Zahnpulpa von Hunden eine ascendierende Neuritis des 3. Trigeminusastes zu erzeugen vermochte, welche sich bis zum Ganglion Gasseri erstreckte und auch dieses noch stark in Mitleidenschaft zog. Es ist durchaus möglich, daß solche Neuritiden die zentripetale Leitung des Tetanustoxins beeinträchtigen oder verzögern; wiesen doch bereits die alten Versuche von *Marie* und *Morax* [16], sowie *Meyer* und *Ransom* darauf hin, daß die Toxinleitung nur in normalen Nerven, nicht aber im degenerierten erfolgen kann.

Betont sei, daß die Entzündung in unseren Experimenten nicht nur den lokalen Tetanus verhinderte oder abschwächte, sondern daß auch im Falle der Entstehung eines lokalen Tetanus kein Übergreifen auf die kontralaterale Hinterextremität und kein kraniales Aufsteigen der Muskelstarre stattfand; eine Ausnahme machte nur Kaninchen 86 (s. Tabelle 3) bei welchem vermutlich die Entzündung zu schwach oder die injizierte Toxindosis schon zu hoch war. Man darf darin einen erneuten Beweis erblicken, daß die Ascendenz dem lokalen Tetanus kausal subordiniert und daß sie im allgemeinen eine Funktion der Intensität des lokalen

Tetanus ist. Nimmt man an, daß die Entzündung die zentripetale Toxinleitung hemmt, so ist die Abschwächung des lokalen Tetanus ebenso wie das Ausbleiben der Ascendenz zu verstehen. Wirkt dagegen das Toxin auf die Muskelfasern oder die terminalen Nervenendigungen direkt ein, so läßt sich weder das Abhängigkeitsverhältnis der Ascendenz vom lokalen Tetanus noch auch der gekoppelte Einfluß der Entzündung auf beide Phänomene befriedigend erklären. Doch müssen die hier begonnenen Untersuchungen fortgesetzt werden, um sie für die Lehre von der Pathogenese des Tetanus in seinen verschiedenen Erscheinungsformen in größerem Ausmaße nutzbar zu machen.

Zusammenfassung.

I. 1. Die Angabe von *Condréa und Poenaru*, wonach man bei der Auswertung hochwertiger Tetanustoxine in der Regel einen höheren Titer erhält, wenn man die Toxinlösungen mit Peptonlösung verdünnt statt mit destilliertem Wasser oder Kochsalzlösung, wird bestätigt.

2. Ursache ist nicht eine Aktivierung des Toxins durch das Pepton *(Condréa* und *Poenaru)*, sondern die große Labilität des stark verdünnten Tetanustoxins in Kochsalzlösung.

3. Die Zerstörung (Inaktivierung) des Toxins in Kochsalzlösung hängt, wenn auch vielleicht nicht ausschließlich, so doch größtenteils vom Luft- bzw. O-Gehalt der Kochsalzlösung ab. Ist die Kochsalzlösung mit Luft gesättigt, so verschwindet das Toxin fast augenblicklich, wenn es hinreichend verdünnt ist. Pepton schützt das oxylabile Toxin durch sein O-Bindungsvermögen; hohe Toxinverdünnungen in Kochsalzlösung lassen sich durch Peptonzusatz stabilisieren.

4. Die versuchstechnischen Konsequenzen, welche sich aus diesen Feststellungen ergeben, werden kurz erörtert.

II. Daß albinotische Meerschweinchen gegen Tetanustoxin weniger empfindlich sind als farbige *(Perrin* und *Cuénot)*, hat sich als unrichtig erwiesen.

III. 1. Wenn man Tetanustoxin beim Kaninchen in entzündete statt in normale Muskeln injiziert, werden sämtliche Formen der Intoxikation antagonistisch beeinflußt:

a) Der lokale Tetanus bleibt aus oder wird abgeschwächt;

b) Wenn sich ein lokaler Tetanus entwickelt, bleibt die sekundäre Ausbreitung der Starre, der „Tetanus ascendens" fast immer aus;

c) Nach hoch genug bemessenen Dosen tritt zwar ein generalisierter Tetanus auf, aber nach ungewöhnlich langer Inkubation und mit protrahiertem Krankheitsablauf.

2. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte dafür, daß das Toxin im entzündeten Muskel rascher zerstört wird als im normalen. In den regionären

Lymphdrüsen entzündeter Muskeln war dagegen stets weniger Toxin nachzuweisen als bei Kontrollen mit nichtentzündeten Drüsen.

3. Die Beobachtungen und ihre Beziehungen zur Theorie der Pathogenese des Tetanus werden erörtert.

Literatur.

[1] *Condréa* et *Poenaru:* C. r. Soc. Biol. Paris **112**, 1482 (1933). — [2] *Doerr* und *Seidenberg:* Z. Hyg. **115**, 206, 549 (1933). — [3] *Ruppin, R.:* Z. Hyg. **116**, 281 (1934). — [4] *Pyl, G.:* Z. Hyg. **114**, 501 (1932); **115**, 546 (1933). — [5] *Perrin* et *Cuénot:* C. r. Soc. Biol. Paris **106**, 199 (1931). — [6] *Ramon* et *Lemétayer:* C. r. Soc. Biol. Paris **119**, 909 (1935). — [7] *Teale* and *Embleton:* J. of Path. **23**, 50 (1919). — [8] *Menkin, V.:* J. of exper. Med. **50**, 171 (1929); **51**, 879; **52**, 201 (1930); **53**, 647, 171 (1931). — [9] *Abel, J.* und Mitarbeiter: Science (N.Y.) **79**, 63, 121 (1934). — Bull. Hopkins Hosp. **56**, 84, 317; **57**, 343 (1935). — [10] *Zupnik, L.:* Dtsch. med. Wschr. **1905 II**, 1999. — [11] *Meyer, H.* u. *Ransom:* Arch. f. exper. Path. **49**, 369 (1903). — [12] *Askanazy:* Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie, Bd. 13, S. 332. 1929. — [13] *Doerr, Seidenberg* u. *Magrassi:* Z. Hyg. **118**, 92 (1936). — [14] *Lasowsky* u. *Kogan:* Virchows Arch. **292**, 428 (1934). — [15] *Spitzer, B.:* Arb. neur. Inst. Wien **34**, 83 (1932). — [16] *Marie* et *Morax:* Ann. Inst. Pasteur **16**, 818 (1902); **17**, 335 (1903). — [17] *Sawamura:* Arb. Inst. Inf. Bern **1909**,, H. 4,1. — [18] *Descombey* et *Robin:* C. r. Soc. Biol. Paris **103**, 576 (1930).

Lebenslauf.

Geboren am 3. 7. 10, besuchte ich die Schulen meiner Vaterstadt Frauenfeld bis zur humanistischen Maturität, die ich im Herbst 1929 bestand.

Für die propädeutischen Studien war ich 5 Semester lang an der Universität Genf immatrikuliert. Die klinischen Studien betrieb ich in Kiel, Zürich, Berlin und schloß sie wiederum in Zürich mit dem eidgenössischen Staatsexamen ab (Frühjahr 1935). Praktische klinische Ausbildung während der Studienzeit als Unterassistent, bes. an der Krankenanstalt Frauenfeld. Während des Wintersemesters 1935/36 experimentelle Arbeit am Hygiene-Institut in Basel.

Karl Halter, med. pract.